

Mutagênese de *Aspergillus niger* 3T5B8 com UV e EMS e caracterização de linhagens quanto ao aumento da produção de celulases e hemicelulases

Jhébica C. Araújo^{1,2*}; Thais D. Mendes²; Edna M. M. Oliveira³;
Mônica C. T. Damaso²; Léia C. L. Fávaro²

Introdução

Um dos principais desafios para a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e químicos renováveis é o aumento da eficiência de hidrólise enzimática dos polissacarídeos. A Embrapa realiza pesquisas em melhoramento genético de fungos produtores de enzimas de interesse biotecnológico por meio de melhoramento convencional e transformação genética (FÁVARO; POLETTO, 2013). A linhagem de *A. niger* 3T5B8 foi previamente selecionada em um programa de melhoramento visando aumento da produção de pectinases (COURI; FARIAS, 1995). Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo dar continuidade ao programa de melhoramento desta linhagem por mutagênese, visando o aumento da produção de celulases e hemicelulases.

Métodos

Dois ciclos de mutagênese foram realizados, sendo o primeiro com ultravioleta (UV) e o segundo com etilmetanossulfonato (EMS). Para a mutagênese com UV, inicialmente foi determinado o tempo de exposição necessário para obtenção de 1-10% de sobrevivência. Para tanto, em sala escura uma suspensão contendo 10^6 conídios/mL foi tratada com UV durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 minutos. Diluições de cada tratamento foram inoculadas em Meio Completo e as placas foram envoltas em papel alumínio e incubadas por 3 dias a 28°C na ausência de luz, de modo a evitar a reversão de mutações pela enzima fotoliase. Conídios não irradiados foram usados como controle para o cálculo de sobrevivência. Uma vez determinado o tempo de exposição à UV, conídios foram tratados com este agente e inoculados em diferentes meios de cultura (Meio Completo e Meio Mínimo contendo Avicel, carboximetilcelulose-CMC, pectina e xilana). As colônias obtidas foram avaliadas quanto ao halo de degradação (CMC, xilana e pectina) e crescimento em Avicel, de modo

1 Universidade de Brasília (UnB), Brasília/DF, Brasil

2 Embrapa Agroenergia, Brasília/DF, Brasil

3 Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba/RJ, Brasil

*jhessica.araujo@colaborador.embrapa.br; leia.favaro@embrapa.br

a selecionar colônias com produção enzimática superior ao parental. Linhagens que apresentaram halo de degradação visualmente superior foram purificadas para obtenção de cultura monospórica e reavaliadas quanto ao índice enzimático (IE) em ensaios com 10 repetições. As melhores linhagens selecionadas foram avaliadas quanto a produção de FPase, β -glicosidase e poligalacturonase em ensaios miniaturizados em microplacas de 96 poços. Mutantes melhorados foram submetidos a um segundo ciclo de mutagênese com EMS. Conídios foram tratados com solução de EMS 10% em diferentes tempos, de modo a obter 1-10% de sobrevivência. Uma vez determinada a dose adequada deste mutágeno, conídios foram tratados e inoculados nos mesmos meios de cultura. As colônias sobreviventes foram avaliadas quanto ao IE em meios seletivos semelhante à metodologia citada no primeiro ciclo, em testes em triplicata. As linhagens superiores foram purificadas para obtenção de cultura monospórica e reavaliadas quanto ao índice enzimático em experimentos com 10 repetições. Os mutantes melhorados do primeiro e segundo ciclos de mutagênese foram avaliados quanto à identidade genética por meio de marcadores RAPD (FÁVARO et al., 2011).

Resultados e Conclusões

O tempo de exposição de 7,5 minutos à radiação UV foi adequado para a obtenção de sobrevivência de 1-10%. No primeiro ciclo de mutagênese foram obtidas 1800 linhagens. Trinta linhagens que apresentaram IE superior ao parental foram selecionadas e avaliadas quantitativamente para a produção de enzimas. Foi possível obter 3 linhagens com produção superior de poligalacturonase e β -glicosidase em ensaios miniaturizados. Estas 3 linhagens foram reavaliadas para confirmação da superioridade, porém observou-se que somente a linhagem C88 apresentou um leve aumento da produção de poligacturonase (7,35 U/mL ($\pm 0,8$)) enquanto que no parental foi observada uma produção de 4,76 U/mL ($\pm 1,7$). Para a produção das demais enzimas não foram observados resultados significativos para essa seleção. Dessa forma, o mutante C88 foi submetido a um novo ciclo de mutagênese com EMS. Foi observada uma taxa de 6,6% de sobrevivência que resultou na seleção de 200 linhagens que foram avaliadas quanto ao IE e crescimento em diferentes substratos. A partir desta triagem, 27 linhagens foram pré-selecionadas por apresentarem IE superior aos parentais 3T5B3 e C88, e foram submetidas à uma nova triagem, utilizando o mesmo método de comparação com dez repetições. Desta forma 8 linhagens foram selecionadas. Em CMC os parentais 3T5B8 e C88 apresentaram IE de 2,426 ($\pm 0,622$) e 2,735 ($\pm 0,632$) respectivamente, enquanto as linhagens P106 (3,347 $\pm 0,293$), P110 (3,443 $\pm 0,218$), P80 (4,107 $\pm 1,089$), P83 (3,583 $\pm 0,276$), P157 (3,228 $\pm 0,161$), P123 (4,799 $\pm 0,599$), P49 (3,473 $\pm 0,285$) foram selecionadas por apresentarem IE superior. Em xilana os parentais 3T5B8 e C88 apresentaram IE de 1,821 $\pm 0,244$ e 1,813 $\pm 0,257$ e as linhagens selecionadas P106 (2,561 $\pm 0,326$), P110 (2,633 $\pm 0,517$), P83 (2,623 $\pm 0,124$), P80 (2,418 $\pm 0,331$), P123

(2,617±0,399) e P49 (2,859±0,481) foram superiores. Em Avicel, apenas a linhagem P157 (4,650 cm ±0,226) apresentou crescimento superior comparado aos parentais 3T5B8 (3,844 cm ±0,247) e C88 (4,281 cm ±0,313). A identidade genética dos 8 mutantes melhorados em comparação aos parentais 3T5B8 e C88 foi avaliada por RAPD. De um total de 100 oligonucleotídeos de RAPD, 23 produziram perfil de amplificação adequado e confirmaram a identidade genética das linhagens. A estratégia utilizada para obtenção de mutantes tem sido satisfatória e obteve-se até o momento uma biblioteca de 2000 linhagens que poderão ser avaliadas futuramente. Os 8 mutantes selecionados estão sendo avaliados quanto à produção de enzimas em cultivo submerso e espera-se obter linhagens com produção enzimática superior para aplicação na desconstrução de biomassa lignocelulósica e para continuidade do programa de melhoramento.

Apoio Financeiro

Embrapa e CNPq

Referências

COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Journal of Microbiology*, Seoul, v. 26, n. 4, p. 314-317, 1995.

FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS One*, San Francisco, v. 6, n. 8, e14828, p. 1-18, 2011.

FÁVARO, L. C. L.; POLETTO, C. M. Bioprospecção e melhoramento genético de fungos para produção de enzimas aplicadas em biocombustíveis. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 35-79.